



TITLE:

ROSを介したTRPチャネル制御機構 に関する研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

三宅, 崇仁

CITATION:

三宅, 崇仁. ROSを介したTRPチャネル制御機構に関する研究. 京都大学,
2017, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20310>

RIGHT:

京都大学	博 士（薬科学）	氏 名	三 宅 崇 仁
論文題目	ROSを介したTRPチャネル制御機構に関する研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>活性酸素種（reactive oxygen species, ROS）とは、生物の呼吸過程において酸素を消費する際に生じるヒドロキシラジカルや過酸化水素などの総称であるが、DNA 損傷をはじめとする細胞毒性のため、生体にとって有害な物質であると考えられてきた。しかし近年、ROS シグナリングと総称される ROS を基点とした細胞内情報伝達機構が存在することが示され、ROS の有益な側面を担う機構として脚光を浴びている。Transient receptor potential (TRP) チャネルはリガンド作動性カチオンチャネルの一群であるが、そのうち数種類は ROS 感受性を有することが知られている。しかし ROS により活性化した TRP チャネルが ROS シグナリングをいかに制御し、またいかなる生理的あるいは病態生理的役割を担っているかは未だ明らかでない。本研究では、第一章及び第二章において中枢神経系の主要な免疫細胞であるミクログリアに発現する ROS 感受性 TRP チャネルである TRPM2 および TRPV1 に、第三章では感覚神経に発現する TRPA1 に着目して以下の検討を行った。</p> <p>第一章 ミクログリアにおける LPS/IFNγ 誘発 NO 産生には ROS により活性化された TRPM2 が関与する</p> <p>ミクログリアに発現する TRPM2 が炎症応答を増大させることは知られていたが、その分子メカニズムは明らかではなかった。そこで新生仔マウスの全脳から単離・調製した初代培養ミクログリアを用い、ミクログリア活性化時の細胞内 Ca²⁺濃度を Ca²⁺イメージング法により測定した。野生型マウス由来（WT）ミクログリアでは、LPS および IFNγ を共処置（LPS/IFNγ）した際に細胞内 Ca²⁺濃度上昇が観察されたが、TRPM2 欠損マウス由来（TRPM2-KO）ミクログリアでは観察されなかった。また WT ミクログリアにおいて観察される細胞内 Ca²⁺濃度上昇は、ROS を産生酵素である NADPH オキシダーゼの阻害薬適用、あるいは細胞外 Ca²⁺除去によりほぼ完全に抑制された。LPS/IFNγ 刺激によって産生される一酸化窒素（NO）について評価したところ、WT ミクログリアにおける NO 産生は、細胞内 Ca²⁺キレート薬や、p38 MAPK 阻害薬、JNK/SAPK 阻害薬の適用により有意に抑制されたが、TRPM2-KO ミクログリアではさらなる抑制は観察されなかった。一方、ERK 経路阻害薬は、いずれの遺伝子型マウス由来ミクログリアにおいても NO 産生を有意に抑制した。以上の結果から、ミクログリアにおいて LPS/IFNγ 刺激により NADPH オキシダーゼが活性化され、それにより産生された ROS が TRPM2 を開口し、細胞内 Ca²⁺濃度上昇や一部の MAPK リン酸化を介して NO 産生増大を引き起こすメカニズムが明らかとなった。</p> <p>第二章 ミトコンドリアに存在する TRPV1 の活性化はミクログリア遊走を惹起する</p> <p>TRPV1 はミクログリアに発現することが知られるが、その生理学的な意義、特に遊走における生理的役割は定かではない。ボイデンチャンバーを用いた遊</p>			

走評価系において WT ミクログリアに TRPV1 選択的刺激薬カプサイシンを処置すると、顕著な遊走反応が惹起され、これは TRPV1 選択的阻害薬 SB366791 存在下や TRPV1 欠損型マウス由来 (TRPV1-KO) ミクログリアを用いた際には観察されなかった。電気生理学的手法や免疫細胞化学的検討により、ミクログリアにおける TRPV1 はミトコンドリアに存在することが示唆されたため、ミトコンドリア膜間電位を蛍光イメージング試薬 JC1 により評価したところ、WT ミクログリアで観察されるカプサイシン誘発性のミトコンドリア脱分極は、SB366791 存在下や TRPV1-KO ミクログリアでは観察されなかった。またカプサイシンにより惹起されるミクログリアの遊走は、電子伝達系阻害薬ロテノンや ROS 除去薬により有意に阻害された。以上の結果より、TRPV1 活性化によって産生されるミトコンドリア由来の ROS がミクログリアの遊走を惹起することが明らかとなった。

第三章 プロリン水酸化阻害による ROS への感受性増大により TRPA1 は冷感受性を獲得する

オキサリプラチン (L-OHP) は大腸がんの使用される白金系抗がん剤であるが、その副作用として寒冷被爆により惹起・増悪する急性末梢神経障害がほぼ全例に発生する。この急性末梢神経障害には ROS 感受性の非常に高い TRPA1 が関与することが示唆されているが、そのメカニズムは明らかではない。そこで Ca^{2+} イメージング法や western blotting 法にて検討した結果、L-OHP やその特徴的な代謝物シュウ酸の細胞膜透過型アナログを前処置すると、プロリン水酸化酵素 (PHD) が阻害されること、およびヒト TRPA1 (hTRPA1) の ROS 感受性が顕著に高まることが明らかとなった。そこで PHD 阻害薬 dimethyloxaloylglycine (DMOG) を前処置すると、hTRPA1 の ROS 感受性は無処置の場合と比べて有意に高いことが示された。さらに冷刺激に対する hTRPA1 の応答を検討すると、無処置の場合では hTRPA1 は冷感受性応答を示さなかったが、DMOG を前処置すると強い冷感受性応答を示し、その応答はミトコンドリア選択的 ROS 除去薬である mitoTEMPO の適用により有意に抑制された。以上の結果より、L-OHP やその特徴的な代謝物であるシュウ酸などによる hTRPA1 プロリン残基の水酸化阻害は hTRPA1 の ROS 感受性を高め、冷刺激により誘発される ROS を感知できるようになり、間接的に冷感受性が与えられることが明らかとなった。このような機序は、臨床的に観察される L-OHP 誘発性冷刺激過敏応答に密接に関与していると考えられる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本研究では**ROS**シグナリングによる**TRP**チャネルの制御機構およびその生理学的・病態生理学的な意義の一端を明らかにした。このことは**ROS**シグナリングが関与する神経疾患の新たな治療薬の創製に有用な知見を提供するものである。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成29年2月17日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。